計畫編號：DOH97-DC-2009

行政院衛生署疾病管制局九十七年度科技研究發展計畫

建立新的痢疾阿米巴基因型別分析系統應用於高危險族群之流行病學調查

研 究 報 告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：嵇達德

研究人員：詹韻仙、陳榮盛

執行期間：97 年 1 月 1 日至 97 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見＊

目錄

	頁 碼
封面	
目錄	(2)
摘要	(3)
前言	(5)
材料與方法	(7)
結果	(10)
討論	(12)
參考文獻	(15)
圖表	(17)

摘要

痢疾阿米巴為世界三大寄生蟲傳染病之一，於世界各地皆可引起嚴重痢疾或侵入性疾病，每年約有 10 萬個病人死於痢疾阿米巴。但非所有的 *E. histolytica* 皆可致病，事實上約只有 1/10 的 *E. histolytica* 感染會產生臨床症狀，真正的原因尚未明瞭，但可能與所感染的菌株種類有關。研究菌株間的變異可以了解他們在遺傳學上的關聯性及在人類族群間的傳播模式。本研究之目的在建立適合台灣現況之新基因型別分析系統，分析臺灣地區高危險族群之阿米巴痢疾盛行率、分子流病基因型別及族群間的傳播模式，並作為疫情防治的參考。今年至 10 月底共有 135 例確定病例，其中 61 人為外勞，35 例為一般國人，79 例為收容機構的病人，近 6 年來痢疾阿米巴的病例似有逐年增加的趨勢。以 *locus 1-2* 為標的進行基因型別分析並與國外其他基因型別阿米巴做流行病學比較，發現在 51 例中，國人感染最多為 D 型(10 例)而外勞則為 C 型 (14 例)、D 型 (8 例)及 M 型(8 例)。C 型 (14 例) 及 M 型(8 例)皆為印尼勞工，而菲律賓勞工則多為 D 型 (6 例)。利用 *srehp* 為基因型別標的，可進一步將 *locus 1-2* 同型的蟲株加以區分，結果顯示痢疾阿米巴並未在外勞間傳播。分析 6 個 tRNA-linked STRs 基因型別標的，結果顯示 locus A-L 及 R-R 的敏感性較差，而 locus D-A 及 S-Q 較好。亦正發展全基因放大技術強化基因型別分析能力，解決檢體因蟲量太少無法分型的問題。

關鍵詞 ：阿米巴痢疾、基因型別、分子流行病學、全基因放大技術、tRNA-linked STRs、*srehp* 及 *locus 1-2*

英文摘要

Amoebiasis is one of three most important parasitic diseases, which results in servere and invasive disease all over the world and causes about 100 thousands death each year. However, no all of *Entamoeba histolytica* strains could cause disease. In fact, only 10% infections could cause clinical symptom, but the mechanism is still not clear, may relate to infected strains. Study of the strain variations could reveal their genetic connection and transmission pattern among humans. The goal of this studt was to set up a new suitable genotyping system for Taiwan that can be use to analyse the prevalence among risk groups, transmission pattern for the disease control. Until the end of October, 2008, there were 135 confirmed cases, 61 cases were foreign labors, 35 cases were Taiwanese, and 79 cases were institutive patients. The amebic cases are increasing in past 6 years. The *Entamoeba locus* 1-2 was used as genotyping marker to analyse clinical samples and compared to other genotype in GenBank. In 51 samples, the most infection in Taiwanese was type D (10 cases), whereas type C (14 cases)、type D (8 cases)及 type M (8 cases) in foreign labors. Two unique types C and M were only found in Indonesia labors. The *Entamoeba srehp* was used for further genotyping to subtype the strains that had same *locus* 1-2 type, the result indicated there was no amebic transmission among foreign labors. Analysis of the 6 tRNA-linked STRs typing method indicated that locus AL and RR had better sensitivity that locus DA and SQ. The technique of whole genome amplification is establishing to resolve the untypable problem because of low parasite amount.

Keyword: *Entamoeba*, genotype, molecular epidemiology, whole genome amplification (WGA) , tRNA-linked STRs, *srehp* and *locus 1-2*

前言

阿米巴痢疾(amoebiasis)為痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*) 藉糞口（fecal-oral）傳染所引起的疾病，主要寄生於腸道，大部分被感染者無症狀，偶爾會伺機穿過腸道黏膜侵入身體其他器官；主要會引發下痢腸炎嚴重者有肝膿瘍的發生。痢疾阿米巴生活史主要有囊體(cyst)及活動體(trophozoite)兩時期。Walsh [1] 於 1981 年估計全球每年有五億人感染過阿米巴痢疾，導致十萬人死亡，故世界衛生組織將之列為重要之熱帶腸道寄生蟲傳染病。

1875 年阿米巴痢疾感染人類首例發表，1903 年將此原蟲命名為痢疾阿米巴原蟲(*Entamoeba histolytica*)，之後陸續發現無症狀病人(asymptomatic carries)體內亦帶有蟲株，1925 年 Emile Brumpt 將此類原蟲重新命名為 *Entamoeba dispar*，於鏡檢下無法區分 *E. histolytica* 與 *E. dispar*，直到 1978 年後，根據生化反應、免疫學反應以及基因序列的不同，將其分為兩個型態相同，但前者有致病力而後者無致病力的兩種 species[2,3]。 感染到痢疾阿米巴的病患，在傳統的鏡檢下無法區分為致病或非致病性的阿米巴，必須分析其遺傳物質 DNA 或特殊的專一性抗原才可區分。

阿米巴感染症為世界性分佈，全球每年高達五億人感染，一般在熱帶及亞熱帶地區發生率較高，嚴重病例及併發症也多發生於此地區，包括墨西哥、中南美洲、西非、南非、南亞及東南亞，但其中 90%的病人通常沒有症狀[4]。台灣近年來自東南亞引進大量外籍勞工，而東南亞亦為各種寄生蟲疾病流行地區，因此可能引入新的寄生蟲病。其中阿米巴痢疾屬第二類法定傳染病，於發現疑似或確定病例時需於 24 小時內通報，感染高危險群主要是長期集體療養之精障及智障人士、男同性戀者、外籍勞工及外籍新娘等。民國 76 年至 79 年間衛生署預防醫學研究所曾對全省 12 所精神病療養機構共 4,803 人之阿米巴痢疾進行血清學（IHA）檢查，發現平均陽性率近 30%，其中以東部某精神醫院之 45.39%最高。83 年則再針對該院進行寄生蟲感染率調查，發現痢疾阿米巴鏡檢陽性率為 10.9%[5]。其他在啟智教養院的調查亦顯示，血清學陽性率約為 13.1%到 44.1%，EIA 陽性率為 3.4%，鏡檢陽性率則為 0.001% 到 15.2% [6-8]。由台大洪建清等人的研究發現男同性戀/HIV 患者亦為痢疾阿米巴的高危險群[9]，但造成流行的阿米巴菌株是由國外傳入或本土流行還需釐清。在非洲南部致病性阿米巴流行地區，*E. histolytica* 與 *E. dispar* 的感染率約為十比一，在印度及中南美洲則將近一比一，其他地區 invasive amoebiasis 則非常少見[10]。isoenzyme pattern 生化分析無法有效區分致病性痢疾阿米巴蟲株[11]，需開發適當之基因分型標的，將 *E. histolytica* 蟲株有效分型，找出較具侵入性的蟲株，並應用於追蹤帶原者，以探討其病理機轉及傳播模式。然而，至今有關 *E. histolytica* 菌株變異及其在疾病的重要性的資訊仍非常缺乏。如何確認哪些受感染個體將會發展出腸道外阿米巴症而非腸道外阿米巴症?同一種蟲株可以同時侵犯腸道並造成肝膿瘍嗎?在同一地區造成阿米巴痢疾傳播的蟲株是否為同一株或由多種蟲株感染?

回答上述問題需要發展一些更有效及可靠的基因分型技術來檢測的 *E. histolytica* 變異性［ 12 ］。

E. histolytic 擁有 linear 染色體及 circular 染色體，位於後者上的 rRNA 基因序列常作鑑定 *Entamoeba* 種別的標的[13,14]，其他基因如 strain-specific gene (*ssg*) [15,16]、serine-rich *E. histolytica* protein 基因(*SREHP*) [17]、chitinas 基因(*chit*) [18] 、asparagine-rich *E. histolytica* antigen 基因(*ariel*) [19]等則被用於基因分型，而 SINE, LINE-like repeat 等 interspersed repeats[20]，則尚未應用於基因分型。然而，到目前國際間對 *E. histolytica* 的基因分型上無統一的標準尚無統一標準，對前述防治問題無法提供較多的訊息，因此本計畫擬針對 *E. histolytica* 的基因分型方法進行探討，評估現有方法的成效並發展新適合台灣現況之新基因型別分析系統，分析臺灣地區高危險族群之阿米巴痢疾盛行率、分子流病基因型別及族群間的傳播模式，並作為疫情防治的參考。本年度的研究目標為評估原有痢疾阿米巴基因型別分析方法，並以 6 個 tRNA 相關的多形性標記(six tRNA-linked STRs polymorphic markers)建立新的基因型別分析方法。

材料與方法

材料

ProSpecT® 痢疾阿米巴微分析盤檢驗套組(ProSpect® *Entamoeba histolytica* Microplate Assay 購自 Remel（USA），Guanidine thiocyanate 購自 Amersham Pharmacia Biotech（USA），矽藻土（Celite®）購自 Merck（Germany），AmpliTaq® DNA polymerase 購自 Applied Biosystems（USA），Platinum® *Pfx* DNA polymerase 及 TOPO TA Cloning Kit for sequencing 購自 Invitrogen（USA）；NuSieve 3:1 agarose 購自 Cambrex（USA），Chelex® 購自 Bioi Rad（USA），痢疾阿米巴蟲株 HM1:IMSS 購自 ATCC（USA），限制酶 *Alu*I 購自 New England BioLabs (USA)，其他藥品均為試藥級。

檢體來源

台灣地區本土精神病院(北、中、南、東部地區)收集之新鮮糞便檢體、國內阿米巴病例通報檢體(包括台灣國人及外籍勞工或外籍新娘)以及國內合作之愛滋病人檢體。

檢體處理及保存

檢體處理與處理依據 Nollau 等提出之方法加以修改而得。取 0.5g 新鮮糞便含 1%之 6M guanidine thiocyanate 混合震盪均勻，室溫下 10 分鐘後，進行 DNA 萃取貨保存於-20℃。萃取 DNA 的方法為將檢體以 14000 rpm 離心 5 分鐘後取其上清液，以 phenol/chlorofom/isoamyl alcohol 分離 DNA。取得 DNA 之後，繼續進行 PCR 反應。

srehp 基因 nested PCR 型別鑑定

Nested PCR 之引子參考 Ayeh-Kumi 等建立之系統，第一階段反應使 SREHP-5(5’-GCT AGT CCT GAA AAG CTT GAA GAA GCT G -3’)/SREHP-3(5’-GGA CTT GAT GCA GCA TCA AGG T -3’)，2.5 μl DNA template，0.5 μM SREHP-5/SREHP-3，PCR buffer (10 mM Tris/HCl、pH 8.3、50 mM KCl)，200 μM dNTP，1.5 mM $MgCl_2$，0.1 μg/μl BSA，0.05 U/μl AmpliTaq® DNA polymerase，反應總體積 50 μl，反應流程為 94℃加熱 2 分鐘，之後 35 個循環，每個循環 denature 94℃, 15 秒；annealing 52℃, 15 秒；extension 72℃, 1 分鐘，最後以 72℃, 6 分鐘中止第一次反應；第二階段反應引子為 nSREHP-5 (5’-TAT TAT TAT CGT TAT CTG AAC TAC TTC CTG -3’)/nSREHP (5’-TGA AGA TAA TGA AGA TGA TGA AGA TG -3’)，第二階段反應為 2 μl 第一階段反應產物，0.5 μM nSREHP-5/nSREHP-3，1X PCR buffer，200 μM dNTP，1.5 mM $MgCl_2$，0.1 μg/μl BSA，0.05 U/μl AmpliTaq® DNA polymerase，反應總體積 25 μl。反應為 94℃加熱 2 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環 denature 94℃, 15 秒；annealing 50℃, 15 秒；extension 72℃, 40 秒，最後以 72℃, 6 分鐘中止反應。反應完成後以 2 % 洋菜瓊脂電泳檢測產物長度。

***locus 1-2* 基因型別鑑定**

根據 Zaki 和 Clark 所建立之 *locus 1-2* PCR 引子對，分別為 R1 (5'-CTG GTT AGT ATC TTC GCC TGT -3')/R2 (5'-CTT ACA CCC CCT TCT TCT ATA ATT -3')，PCR 反應為：5 µl DNA template，0.5 µM R1/R2，PCR buffer，200 µM dNTP，2.5 mM $MgCl_2$，0.05 U/µl AmpliTaq® DNA polymerase，反應總體積為 50 µl。反應流程為 96℃加熱 5 分鐘後，進行 30 個循環反應每個反應為：denature 94℃, 1 分鐘；annealing 60℃, 1 分鐘；extension 72℃, 2 分鐘，最後以 72℃, 5 分鐘終止反應。反應完成後以 2% 洋菜瓊脂電泳檢測產物長度，PCR 反應產物經過純化回收後，進行 DNA 核酸序列分析。

***STRs-containing loci* 基因型別鑑定**

所有 STRs-containing loci PCRs 的反應條件皆相同，除了每個的 annealing temperature 不同外。每一個反應含 35 個循環，其中 denaturation 溫度為 94℃反應 30 秒、而 annealing temperature 則依照不同引子的溫度【如表一】作改變，其反應時間亦為 30 秒、而 extension 溫度為 72℃，反應時間 30 秒，以上為 35 個循環，在 PCR 最後則加入 5 分鐘 72℃的 final extension，即完成 PCR 反應。反應完成後以 1.5% 洋菜瓊脂電泳檢測產物長度。利用【如表一】中所有的引子而產生的 PCR 產物，一具個產物之大小不同做出統計分析，進一步訂出型別[21,22]。

附表一

E. histolytica-specific primers		
AL-H5	CATCTCCATTATTATCTAGATATCCT TTATTACT	57
AL-C	GGCACGAATGCTTTGATATATAA	
DA-H5 (Hsp1)[d]	GAGTTCTCTTTTTATACTTTTATA TGTT	50
DA-H3 (Hsp2)[d]	ATTAACAATAAAGAGGGAGGT	
NK2-H5	GAAGCGTCTTTTTTACTATTAGTG	59
NK2-H3	GGCGTATTTTTAGAATAGGATAAG	
RR-H5	GCGCCTTTTTATTCAATATACTCC	57
RR-H3	GGATGAAGATATCTTCACAGGG	
$S^{TGA}D$-H5	AAATCCTGCCACTGTCGTAA	58
$S^{TGA}D$-H3	AATCCCCGTTGAAGAGTTCT	
SQ5	GTGGTCTAAGGCGTGTGACT	55
SQ-H3	GTGGGACCACTTTTTATACCTA	

PCR 產物之選殖及定序

為進一步分析 *srehp* 及 *locus1-2* 之基因序列，另採具 3' to 5' exonuclease 校勘活性之 Platinum® *Pfx* DNA polymerase 進行 PCR 反應，條件如下：5 µL template DNA，0.3 µM primer mix，1X *Pfx Amplification buffer*，1.0 mM $MgSO_4$，0.3 mM dNTP mixture 及 1.25 U *Pfx* DNA polymerase，反應最終體積為 50 µL，在 94 ℃加熱 3 分鐘後，進行 35 個循環反應，每個循環包括：94℃ ×15 秒，60℃ ×15 秒，68℃ × 2 分鐘。

PCR 產物之選殖使用 TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing，將上述 *srehp* 及 *locus1-2*

之增幅產物插入 pCR 4-TOPO 載體中，轉感大腸桿菌，經培養後純化其質體。以限制酵素及洋菜膠電泳確定為 *srehp* 及 *locus1-2* 之增幅產物，再進行單邊 DNA 定序，以 BLAST 程式將部份序列與 GeneBank 資料庫比對後，再進行全長定序。

結果

Srehp 及 *Locues1-2* 做為台灣痢疾阿米巴高危險族群基因型別分析之成效

由於 *Locues1-2* 為 single copy 之基因，在我們先前之研究中，常發生有些痢疾阿米巴 18s rRNA PCR 陽性檢體，無法同時或個別 PCR 增幅出 *Srehp* 及 *Locues1-2* 基因片段，而使得用後續的型別分析產生困難。我們雖已改進 PCR condition，可增幅出較多檢體中的 *Locues1-2* 片段，以進行基因分型的分析，但仍需改進其檢體的檢出率。

Locus typing 結果與基因親緣演化圖分析

本研究已將今年度至 10 月底所有國人以及外勞阿米巴痢疾陽性病患檢體 96 例使用 *locus 1-2* 為標的進行 nested PCR 並定序分析，其中外國籍陽性病患可進行 *locus 1-2* typing 的比率為 57.3%（35/61），而國人可 typing 的比率則為 45.7%（16/35），有 45 例檢體無法直接以 nested PCR 增幅分析。將上述 51 例 *locus 1-2* typing 的定序使用 Mega4 分析親緣演化軟體做親緣關係分析並與國外其他基因型別阿米巴做流行病學比較，如圖一所示。可以發現國人主要感染的族群為 type D (10 例)，而外籍人士主要感染族群為 type C (14 例)、type D (8 例)及 type M (8 例)三個族群。國人在 type B、E、F、G 四個族群的有少數感染，且其中 type G 為外勞所沒有，但在愛滋病患常見的型別，結果較為特殊。深入分析不同國籍外籍人士的型別，可以發現 type C 及 M 病患皆為印尼勞工，而菲律賓勞工主要感染族群為 type D，越南勞工則只有一例為 type B，在其他國籍人士只有一例為 type E 的日本人，而無泰國勞工檢出。

Locus 與 Sreph typing 的比較與分析

進一步利用 *srehp* 為基因型別標的進行 nested PCR 並將其定序分析，可進一步將 *locus* 1-2 同型的蟲株加以區分，結果如表二所示。在 *Locus* 1-2 型別為 type C 的 B4、B6 及 B8 檢體可被 *Sreph* 分為兩型，其中兩個檢體為 *Sreph* type 3，另一個為 type 4。同樣的在 *Locus* 1-2 型別為 type D 及 M 的檢體也可被 Sreph 分為 *Sreph* type 10 與 6，以及 *Sreph* type 5 與 1 等四個 type。此外 *Locus* 1-2 type D 的兩個病患皆為菲律賓籍。上述結果顯示痢疾阿米巴並未在外勞間傳播。

6 組 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法的建立

發展較精確的 *E . histolytica* strain-specific 診斷，可以幫助我們預測哪些無症狀病人未來可能發病。因此我們發展 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法，利用其 repeats 的多型性來區分不同蟲株間的差異。我們現已完成 6 個 tRNA- linked STRs PCR condition

的測試。如圖二所示，其中圖 a 為 *E. histolytica* HM1 strain 陽性對照組，圖 b 至 f 為可被 *Locus* 1-2 分型的痢疾阿米巴陽性檢體，圖 g 及 h 為無法被 *Locus* 1-2 分型的檢體，圖 i 為陰性對照組。結果顯示可被 *Locus* 1-2 分型的檢體，若使用這六組 tRNA-linked STRs 引子對大部分都能成功增幅產生 PCR 產物，但不是所有的引子對皆會成功，此外無法被 *Locus* 1-2 分型的檢體則皆未能有效增幅。其中圖譜相近的圖 c 及圖 d，分析其 *Locus* 1-2 型別結果皆為 type E，而其它圖譜差異較大的檢體則皆屬於不同的 *Locus* 1-2 型別。 雖然，先前的研究認為此方法可以非常可靠的由糞便、肝膿瘍或是純培養中檢測到 *E. histolytica* 並由片段大小區分其差異無須再以限制脢切割等方法後續分析，但是我們也發生無法將一些 18s rRNA PCR 陽性檢體以每一組 tRNA-linked STRs 引子對增幅出來，現在正在改進 PCR condition，未來或許可選擇其中 3-4 個較穩定的 tRNA-linked STRs 引子對進行後續分型的方法。

台灣高危險族群阿米巴檢體的收集

台灣造成痢疾阿米巴的感染的高危險群有外籍勞工，精智障教養機構院生、疫區返國者、男同性戀/HIV 患者及偏遠地區住民 [23, 24]。精智障教養機構之住民因集體生活及異常行為，為阿米巴感染症除外籍勞工外最主要的高危險群。近幾年的資料顯示痢疾阿米巴的檢體及通報病例的數量皆有增加。但因其中包含精智障教養機構院生病例，無法呈現完整的流行趨勢。若將各族群分別統計（圖三），可發現歷年來痢疾阿米巴患者數，不論國人或者外勞都有明顯增加趨勢，而今年度統計至 10 月份國人的部份已經有 35 例確定病例，外勞則多達 61 件確定病例。而精智障養護機構爆發阿米巴痢疾群聚的件數則每年有所不同，屬於非常態性質，今年度已發生三次養護機構阿米巴痢疾群聚事件有 79 件確定病例。 若將 97 年度的確定病例（分國人與外勞兩項統計圖），以月份來統計之，如圖四以及圖五所示，從圖表中顯示國人痢疾阿米巴流行期主要為 1-5 月，而 5 月份過後疫情漸漸趨緩。外勞則不論何月份都有著相當數量的感染人數。9 月較為特殊，國人無確定病例且外勞的確定病例數也較少。統計至今年 10 月截止，痢疾阿米巴通報檢體的陽性病患檢出率國人與外勞分別為 20.2％以及 27.9％。

全基因放大技術之研發

有鑑於本研究在進行 typing 實驗時，常會遇到因為檢體蟲數太少，超過 nested PCR 所能偵測到 DNA 的極限，而痢疾阿米巴原蟲又無法培養，因此發展全基因放大技術 (whole genome amplification method; WGA) 希望先放大原始檢體中 DNA 的總量。本研究先使用 *E. histolytica* HM1 strain parasites 來發展此技術，並使用痢疾阿米巴 18S rDNA real-time PCR 來檢測期敏感度，未使用 WGA 方法時只有蟲量超過 3×10^{1} parasites/reaction 以上才可以偵測到，在經過 WGA 後，則至 3×10^{-2} parasites/reaction 的檢體都可偵測到，此法能有效的將原始檢體 DNA 的量放大 10^{3} 倍。

討論

Locus 1-2 typing 與基因親緣演化圖分析

目前所使用的 *Locus* 1-2 及 *srehp* typing 方法缺點為無法將所有 SSU rRNA PCR 陽性檢體增幅出來分析其型別。主要的原因是檢體蟲數太少，超過 nested PCR 所能偵測到 DNA 的極限，而痢疾阿米巴原蟲又無法培養增加體蟲數量。但 Locus 1-2 typing 的優點為產物單一 PCR 產物，產物可直接定序分析。因此本研究希望發展全基因放大技術(whole genome amplification method; WGA)放大原始檢體中 DNA 的總量解決此問題，提高 *Locus* 1-2 PCR 的成功率，以便分析檢體進行流行病學分析。此外，本研究將進一步使用限制酵素切割建立指紋圖譜與來分析各型別之間的關係，以期能進行更快速的型別分析，達到快速的提供防疫策略資訊，建立有效的防疫網絡。

使用基因親緣演化圖分析今年度 51 例陽性病患檢體的 *Locus* 1-2 基因型別 (圖一)，發現幾點值得探討的問題，到今年 9 月底止據勞委會統計約有 36 萬 8 千名外勞引入台灣， 其中印尼勞工有 12 萬 4 千人，菲律賓勞工有 8 萬 4 千人，泰國勞工有 8 萬 1 千人，越南勞工 8 萬。而台灣的外籍看護工及家庭幫傭最多為印尼勞工約有十萬 7 千人，其次為越南勞工 3 萬 3 千人，菲律賓勞工有 2 萬 1 千人，他們因為會長期生活於雇主的家庭，因此若不加防範有可能將痢疾阿米巴傳染給雇主或家庭成員。然而，由 *locus 1-2* typing 的分析結果來看感染率最高的外勞國籍為印尼，有 26 人且主要型別為 type C 及 M，但國人及其他國籍外勞並無此型別的感染。因此，印尼勞工的感染應發生於印尼本國，未來應加強並落實印尼勞工輸入前的檢驗工作。而菲律賓外勞主要感染型別為 type D，則與國人主要感染型別相同，可能原因有兩項，第一，台灣及菲律賓主要流行之痢疾阿米巴型別可能相同；第二，此型別的可能是由菲律賓境外移入或是菲勞在台灣所感染，但結果事實為何，仍需進一步的探討。國人中發現的 type G 為外勞所沒有，但是國內外愛滋病患常見的型別，結果較為特殊，可追蹤感染此型別的兩位國人，了解其狀況及進行衛教。此外，在許多報告亦顯示 type E 以及 B 的族群許多皆為 HIV 患者，故可以深入分析此族群的患者是否為 HIV 患者[25]。此外，越南勞工只有一例為 type B，而泰國勞工無檢出。

Locus 1-2 與 *Sreph* typing 的比較與分析

Locus 1-2 typing 產物為單一 PCR 產物，可快速進行型別分析；而 Sreph typing 的 PCR 產物較複雜，因 genome 可能有數個 Sreph 基因 copy，常為多條 PCR 產物，因此可以發展 RFLP 進行較細的分型，將 Locus 1-2 所初分的型別再加以細分，以彌補 Locus 1-2 typing 不足的地方。如表二所示。在 *Locus* 1-2 型別為 type C 的 B4、B6 及 B8 檢體可被

Sreph 分為兩型，其中兩個檢體為 *Sreph* type 3，另一個為 type 4。同樣的在 *Locus* 1-2 型別為 type D 及 M 的檢體也可被 Sreph 分為 *Sreph* type 10 與 6，以及 *Sreph* type 5 與 1 等四個 type。此外 *Locus* 1-2 type D 的兩個病患皆為菲律賓藉。上述結果顯示痢疾阿米巴並未在外勞間傳播，外勞的感染應發生於其母國。Sreph typing 缺點為有些型別有多條 PCR 產物的存在，無法利用直接定序來分析。有些 Locus 1-2 typing 失敗的檢體，卻可以使用 Sreph typing 成功增幅，這方面的相互關係值得在進一步的深入探討之，故希望提升檢體檢出的數目，希望能得到更好的相互結果，以求其這兩方法之間型別的相互關係 [26, 27, 28] 。

6 組 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法的建立

精確的 *E . histolytica* strain-specific 診斷，可建立較精準的流行病學資料，對阿米巴痢疾所造成的世界健康負擔有較好的評估。也可以幫助我們預測哪些無症狀病人未來可能發病，需先給予治療。要解決上述問題需要發展一些更有效及可靠的基因分型技術來檢測的 *E . histolytica* 變異性。因此我們發展 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法，利用其 repeats 的多型性來區分不同蟲株間的差異。從圖二中可以發現，使用這六組 tRNA-linked STRs 引子對大部分都能成功增幅產生 PCR 產物，但不是所有的引子對皆會成功，此外無法被 *Locus* 1-2 分型的檢體則皆未能有效增幅。*Locus* SQ、DA 以及 $S^{TGA}D$ 的引子對可增幅大部份的檢體，且 *Locus* SQ 為單一 PCR 產物，可直接定序分析。以可被 *Locus*1-2 typing 的檢體來做此六組 tRNA-linked STRs 引子對的分析(圖二、b-f)，可以發現 Locus1-2 屬於 Type M、B、E 以及 D 的檢體，其電泳圖譜互不相同，而同屬 Locus1-2 Type E 的檢體則有較相近的電泳圖譜，故可以在將所有 Locus typing 可以分型之檢體在使用此方法，近一步的探討之間的相關性，應該可以得到更佳的分析以及結果，或者能搭配 WGA 方法使其專一性更佳提高，或許可以得到更佳的圖譜 [29]。 我們也發現有一些 18s rRNA PCR 陽性檢體無法被每一組 tRNA-linked STRs 引子對增幅出來，現在正在改進 PCR condition，未來或許可選擇其中 3-4 個較穩定的 tRNA-linked STRs 引子對進行後續分型的方法。

全基因放大技術之研發

在發展此 WGA 技術時，發現檢體在 WGA 放大後直接 PCR 增幅的效果不穩定，但以 real-time PCR 偵測 WGA 產物結果較好，但 Ct value 也有後移增加的現象。可能原因為 WGA 產物是以 random primer 隨機放大，而一般 PCR 產物較大(>300 bp)，若未將 WGA 產物中的 random primer 移除，即會干擾正常 PCR 的進行，而 real-time PCR 產物較小(<150 bp)，同時有添加專一性 probe 來偵測 PCR 產物，因此雖有干擾但仍能測得結果。 故在 WGA 放大完成後，應該先將產物中的 random primer 及其他酵素移除，再進行下一步驟的實驗。未來將先發展去除 random primer 及其他酵素的方法，增加 WGA

方法的穩定性，希望未來能提高痢疾阿米巴蟲株 typing 的成功率 [30]。

阿米巴痢疾高危險族群的檢體收集及病例統計

今年度精智障養護機構的阿米巴痢疾群聚事件，主要皆發生在同一所養護機構，總共有 69 位病患感染，後續將盡快以今年所建立之基因分型原則，進行基因型別分析，期能釐清感染來源，了解是否為單一傳染源或者為多重的傳染源。 分析近年的確定病例數，發現國人以及外勞感染痢疾阿米巴的人數有明顯增加，這可能與 1. 近年來本實驗室積極協助檢驗，提昇檢驗技術的敏感性及準確性，及醫療人員知識的增加有著相當大的關係，2. 過去痢疾阿米巴的病患有比較低估的現象，3. 與外籍勞工開放的政策及 MSM/愛滋病患族群人數增加有著相關連性，但仍須近一步探討這之間的關係。藉由基因型別分析可以探討是否國人與外勞的感染是否有相關否，並有效的幫助如何執行防疫政策及方法。

參考文獻

1. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis.* Mar-Apr 1986;8(2):228-238.

2. Dimond LS, Clark CG. A redescription of Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from Entamoeba dispar Brumpt, 1925. *J Enkaryot Microbiol*. May-Jun 1993;40(3):340-344.

3. Anonymous. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. *Epidemiol Bull*. Mar 1997;18(1):13-14.

4. Ravid JI: Amebiasis. Clin Infect Dis 1995; 20: 1453-1466

5. 翁秀貞、鄭美英、劉國輝等：台灣某精神醫院寄生蟲罹患狀況調查—特別著重於痢疾阿米巴之檢查。疫情報導，民國84年；第11卷第7期：179-183 頁。

6. 趙黛瑜、吳炳輝、陳國東：省立某教養院痢疾阿米巴感染之研究。疫情報導，民國86年；第13卷第5期：135-144 頁。

7. 江大雄、張國慧：某啟智教養院阿米巴痢疾爆發流行事件之研究。公共衛生，民國89年；第二十6卷第4期：261-270 頁。

8. 鄧洪音1、蕭偉宏. 台灣某啟智教養院內腸道痢疾阿米巴致病性種別分析及流行病學研究。疫情報導，民國94年；第21卷第1期：1 -19 頁。

9. Hung C-C, Deng, H-Y., Hsiao, W.-H., Hsieh, S.-H., Hsiao, C.-F., Chen, M.-Y., Chang, S.-C., Su, K.-E. 2005. Invasive amebiasis is an emerging parasitic disease in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection in Taiwan. *Arch. Intern. Med*. 165(4):409-15.

10. Stanley SL, Jr. Amoebiasis. *Lancet.* Mar 22 2003;361(9362):1025-1034.

11. Sargeaunt PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive Entamoeba histolytica by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1978;72(5):519-521.

12. Paul J, Srivastava S, Bhattacharya S. 2007. Molecular methods for diagnosis of Entamoeba histolytica in a clinical setting:an overview.Exp Parasitol. 116(1):35-43.

13. Bhattacharya S, Som, I., Bhattacharya, A. The ribosomal DNA plasmids of *Entamoeba*. *Parasitol. Today.* 1998;14:181-185.

14. Silberman JD, Clark CG, Diamond LS, Sogin ML. Phylogeny of the genera Entamoeba and Endolimax as deduced from small-subunit ribosomal RNA sequences. *Mol Biol Evol.* Dec 1999;16(12):1740-1751.

15. Burch DJ, Li E, Reed S, Jackson TF, Stanley SL, Jr. Isolation of a strain-specific Entamoeba histolytica cDNA clone. *J Clin Microbiol.* Apr 1991;29(4):696-701.

16. Clark CG, Diamond LS. Entamoeba histolytica: a method for isolate identification. *Exp Parasitol.* Dec 1993;77(4):450-455.

17. Li E, Kunz-Jenkins C, Stanley SL, Jr. Isolation and characterization of genomic clones encoding a serine-rich Entamoeba histolytica protein. *Mol Biochem Parasitol.* Feb 1992;50(2):355-357.

18. de la Vega H, Specht CA, Semino CE, et al. Cloning and expression of chitinases of Entamoebae. *Mol Biochem Parasitol.* Apr 1997;85(2):139-147.

19. Mai Z, Samuelson J. A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich Entamoeba histolytica antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich E. histolytica protein. *Infect Immun.* Jan 1998;66(1):353-355.

20. Van Dellen K, Field J, Wang Z, Loftus B, Samuelson J. LINEs and SINE-like elements of the protist Entamoeba histolytica. *Gene.* Sep 4 2002;297(1-2):229-239.

21. Ali IK, Zaki M, Clark CG. 2005. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping Entamoeba histolytica. J Clin Microbiol. 43(12):5842-7.

22. Ali , I.K. M., U. Mondal, S. Roy, R. Haque, W. A. Petri and C. G. Clark. 2007. Evidence for a Link between Parasite Genotype and Outcome of Infection with *Entamoeba histolytica.* J. Clin. Microbiol.,45: 285–289.

23. Hung CC, Ji DD, Sun HY, Lee YT, Hsu SY, Chang SY, Wu CH, Chan YH, Hsiao CF, Liu WC, and Colebunders R: Increased Risk for *Entamoeba histolytica* Infection and Invasive Amebiasis in HIV Seropositive Men Who Have Sex with Men in Taiwan. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2008. 2(2): e175.

24. Chang SY, Sun HY, Ji DD, Lo YC, Wu CH, Wu PY, Liu WC, Hung CC, Chang SC. Cost-Effectiveness of Detection of Intestinal Amebiasis Using Serologies and Specific Amebic Antigen Assays among Persons with or without Human Immunodeficiency Virus Infection. J Clin Microbiol. 2008. 46 (9):3077-93079.

25. Haghighi, A, S Kobayashi, T Takeuchi, G Masuda, and T Nozakil. Remarkable Genetic Polymorphism among Entamoeba histolytica Isolates from a Limited Geographic Area. J Clin Microbiol. 2002. 40:4081–4090.

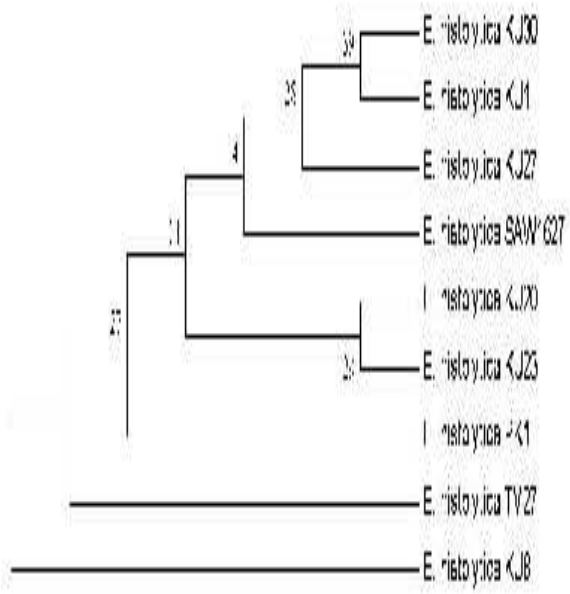
26. Haghighi A, S Kobayashi, T Takeuchi, N Thammapalerd, and T Nozaki1. Geographic Diversity among Genotypes of Entamoeba histolytica Field Isolates. J Clin Microbiol. 2003. 41: 3748–3756

27. Ayeh-Kumi PF, IMLA Lockhart, CA Gilchrist, WA Petri, Jr., and R Haque. Entamoeba histolytica: Genetic Diversity of Clinical Isolates from Bangladesh as Demonstrated by Polymorphisms in the Serine-Rich Gene. Exp. Parasitol. (2001). 99: 8–88.

28. Simonishvili S, S Tsanava, K Sanadze, R Chlikadze, A Miskalishvili, N Lomkatsi, P Imnadze, WA Petri Jr., N Trapaidze. Entamoeba histolytica: The serine-rich gene polymorphism-based genetic variability of clinical isolates from Georgia. Exp. Parasitol. (2005). 110: 313–317.

29. Ibne Karim M. Ali, Mehreen Zaki, and C. Graham Clark. Use of PCR Amplification of tRNA Gene-Linked Short Tandem Repeats for Genotyping Entamoeba histolytica. J Clin Microbiol. 2005. 43: 5842–5847.

30. Dean FB, JR Nelson, TL Giesler and RS Lasken. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Res.* 2001. 11: 1095-1099.



Type	Nationality					
Locus1-2	國人	外國籍	菲律賓	越南	印尼	日本
G	2	0	0	0	0	0
B	1	2	1	1	0	0
C	0	14	0	0	14	0
A	0	0	0	0	0	0
F	1	0	0	0	0	0
D	10	8	6	0	2	0
M	0	8	0	0	8	0
K	0	0	0	0	0	0
E	2	3	0	0	2	1
總計	16	35	7	1	25	1

Figure 1. 痢疾阿米巴之 *Locus*1-2 基因型別及病患國籍分析圖

case NO.	LOCUS	SREPH	Nationality
B4	C	3	Indonesia
B6	C	3	Indonesia
B8	C	4	Indonesia
B9	D	10	Philippines
B11	D	6	Philippines
B12	E	3	Indonesia
B1	M	5	Indonesia
B13	M	1	Indonesia

Table 2. 痢疾阿米巴 *Locus*1-2 與 Sreph typing 的比較表

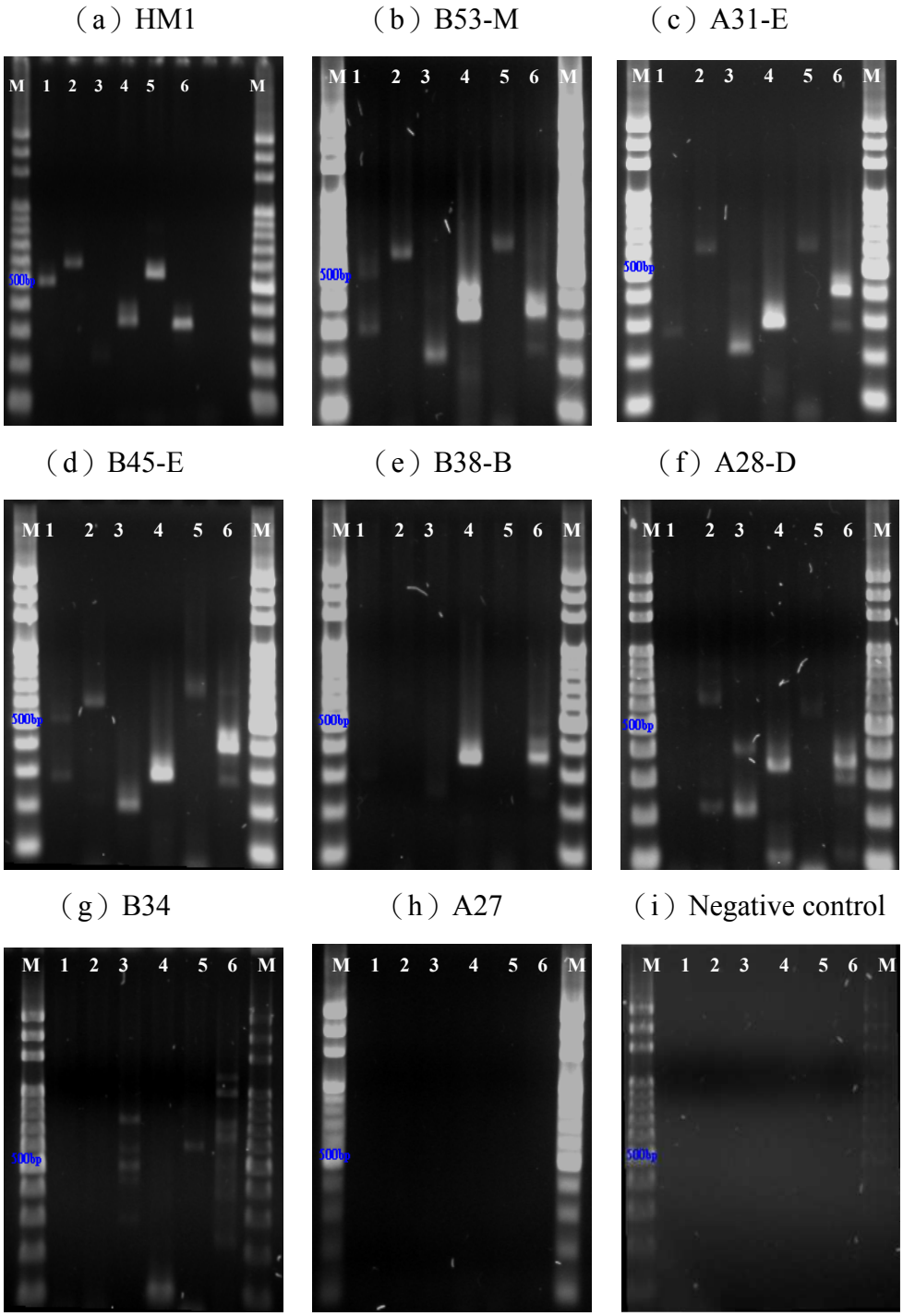


Figure 2. 6 組 tRNA-linked STRs 新基因型別分析方法之測試。 HM1 indicated *Entamoeba histolytica* HM1 strain, whereas B53-M, A31-E, B45-E, B38-B, A28-D, B34 and A27 indicated *E. histolytica* strains from patients. M indicated marker; Lane 1-6 indicated PCR reactions by *Locus* AL, RR, $S^{TGA}D$, DA, NK2, SQ primer pairs, respectively.

痢疾阿米巴歷年族群統計表

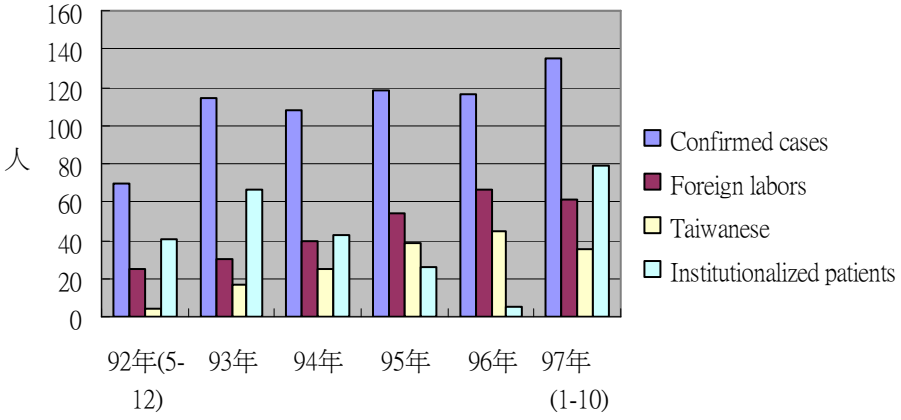


Figure 3、歷年痢疾阿米巴確定病例統計圖表

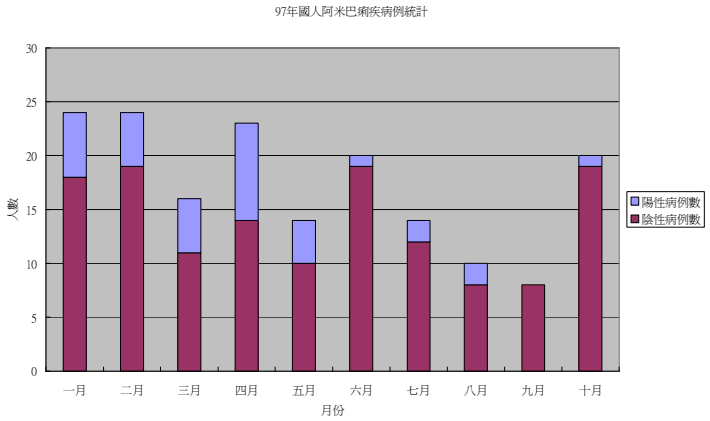


Figure 4、97 年度國人痢疾阿米巴確定病例統計圖

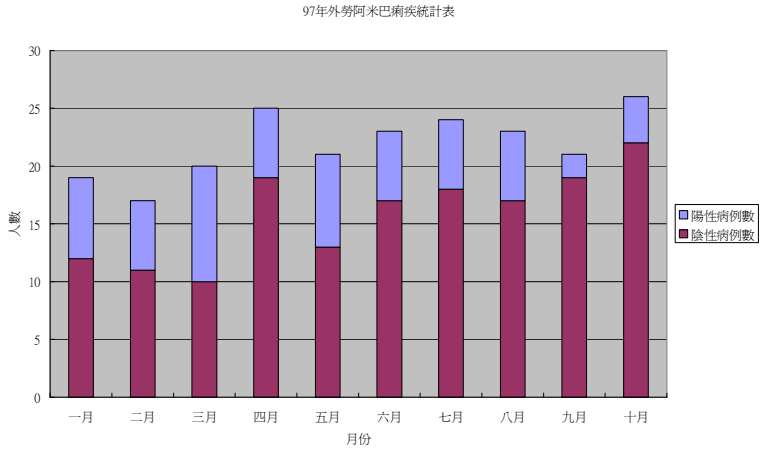
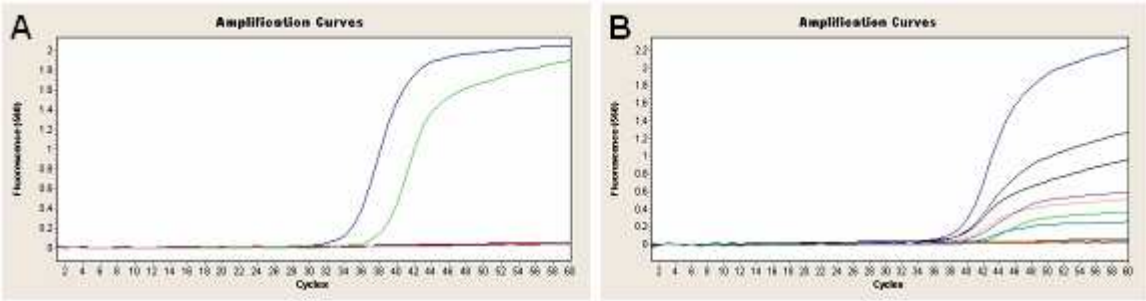


Figure 5、97 年度外勞痢疾阿米巴確定病例統計圖



C

Paraistes/Rx	3×10^{1}	3×10^{0}	3×10^{-1}	3×10^{-2}
Without amplification	+	—	—	—
With amplification	+	+	+	+

Figure 6. Detection limits and linearity of the water serial diluted Entamoeba histolytica DNA without (A) or with (B)Multiple Displacement Amplification evaluated by EntaTaq real-time PCR. (A) Before amplification: DNA was diluted to ■ : 3×10^{2} paraistes/Rx; ■ : 3×10^{1} paraistes/Rx; ■ : 3×10^{0} paraistes/Rx; ■ : 3×10^{-1} paraistes/Rx; ■ : 3×10^{-2} paraistes/Rx; (A) Diluted DNA was amplified and diluted for EntaTaq. (1) . ■ : 3×10^{1} paraistes/Rx amplification and then dilution to ■ : 3×10^{1} $\times10^{-1}$ paraistes/Rx; ■ : 3×10^{1} $\times10^{-2}$ paraistes/Rx; (2) . ■ : 3×10^{0} paraistes/Rx amplification and then dilution to ■ : 3×10^{0} $\times10^{-1}$ paraistes/Rx; ■ : 3×10^{0} $\times10^{-2}$ paraistes/Rx; (3) . ■ : 3×10^{-1} paraistes/Rx amplification and then dilution to ■ : 3×10^{-1} $\times10^{-1}$ paraistes/Rx; ■ : 3×10^{-1} $\times10^{-2}$ paraistes/Rx; (4) . ■ : 3×10^{-2} paraistes/Rx amplification and then dilution to ■ : 3×10^{-2} $\times10^{-1}$ paraistes/Rx; ■ : 3×10^{-2} $\times10^{-2}$ paraistes/Rx.